

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5525880号
(P5525880)

(45) 発行日 平成26年6月18日(2014.6.18)

(24) 登録日 平成26年4月18日(2014.4.18)

(51) Int.Cl. F I
GO 2 B 21/00 (2006.01) GO 2 B 21/00
GO 1 N 21/64 (2006.01) GO 1 N 21/64 E

請求項の数 2 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2010-65909 (P2010-65909)	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成22年3月23日 (2010.3.23)		オリンパス株式会社
(62) 分割の表示	特願2003-304711 (P2003-304711) の分割		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
原出願日	平成15年8月28日 (2003.8.28)	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(65) 公開番号	特開2010-152397 (P2010-152397A)	(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
(43) 公開日	平成22年7月8日 (2010.7.8)	(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
審査請求日	平成22年3月23日 (2010.3.23)	(74) 代理人	100109830 弁理士 福原 淑弘
(31) 優先権主張番号	特願2002-250824 (P2002-250824)	(74) 代理人	100075672 弁理士 峰 隆司
(32) 優先日	平成14年8月29日 (2002.8.29)	(74) 代理人	100095441 弁理士 白根 俊郎
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 走査型レーザー顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

可視領域にスペクトルを有する第1のレーザー光を試料上で走査して前記試料を励起して蛍光を発生させる第1の走査光学系と、

前記第1の走査光学系内の光路中に配されて前記試料からの蛍光を前記第1のレーザー光の光路から分離する第1ダイクロイックミラーと、

前記第1ダイクロイックミラーで分離された蛍光を検出する光検出器と、

前記第1ダイクロイックミラーと前記光検出器との間に配置され前記第1のレーザー光を遮断し前記蛍光を透過する測光フィルタと、

紫外または赤外領域にスペクトルを有する第2のレーザー光を試料上の特定の部位に導入するための第2の走査光学系と、

前記第1ダイクロイックミラーと前記光検出器との間に配置され前記第2のレーザー光の透過を制限する吸収フィルタと、

前記吸収フィルタを複数配設することができる第1切換手段と、
を備え、

前記第1切換手段には、紫外領域にスペクトルを有するレーザー光の透過率を0.01%以下とする透過特性を有する吸収フィルタ、及び、赤外領域にスペクトルを有するレーザー光の透過率を0.01%以下とする透過特性を有する吸収フィルタが配設され、

前記光検出器と前記測光フィルタが複数設けられ、光検出器に向けて試料からの蛍光を分光する第2ダイクロイックミラーを前記第1ダイクロイックミラーと光検出器との間に

10

20

備え、前記吸収フィルタは、前記第1ダイクロイックミラーと前記第2ダイクロイックミラーとの間に配置され、前記測光フィルタはそれぞれの光検出器と前記第2ダイクロイックミラーとの間に配置された走査型レーザ顕微鏡であって、

前記第2の走査光学系の第2のレーザ光の光源として、紫外領域にスペクトルを有するレーザ光源と、赤外領域にスペクトルを有するレーザ光源を有し、

前記第2の走査光学系は、前記2つのレーザ光源のうちの1つを前記第2のレーザ光の光源として選択するレーザ選択手段を有し、

前記第1切換手段は、前記レーザ選択手段と連動して対応する前記吸収フィルタを配置する走査型レーザ顕微鏡。

【請求項2】

10

前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を前記第2のレーザ光の光路から分離する第3ダイクロイックミラーと、

前記第3ダイクロイックミラーを複数配設することができる第2切換手段と、
をさらに備え、

前記第2切換手段には、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を紫外領域にスペクトルを有する前記第2のレーザ光から分離する特性を有する第3ダイクロイックミラー、及び、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を赤外領域にスペクトルを有する前記第2のレーザ光から分離する特性を有する第3ダイクロイックミラーが配設され、

前記第2切換手段は、前記レーザ選択手段と連動して対応する前記第3ダイクロイックミラーを前記試料と前記第1ダイクロイックミラーとの間に配置する請求項1に記載の走査型レーザ顕微鏡。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レーザ光を試料上に走査して試料からの蛍光を光検出器により検出する走査型レーザ顕微鏡に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献1には、試料からの蛍光の走査画像を得るための第1の走査光学系Aと、試料の特定の部位に、例えばケージド試薬の開裂のような特異現象を発現させるための第2の走査光学系Bとを備えた走査型レーザ顕微鏡について開示されている。

30

【0003】

図7は、従来の走査型レーザ顕微鏡の構成を示す図である。第1の走査光学系Aのレーザ光の走査に同期して第2の走査光学系Bから試料79にレーザ光を照射して、試料79が時間的に変化する様子を測定することができる。同期は、コントロールユニット81が、第1の走査光学系Aのレーザシャッタ63と走査光学系ユニット64および光電変換素子70と、第2の走査光学系Bのレーザシャッタ72および走査光学系ユニット73を制御することで行われる。

【0004】

40

ケージド試薬とカルシウムイオンなどのイオン濃度に感受性を有する蛍光指示薬とを試料79に導入する。第2の走査光学系Bのレーザ光源71からのレーザ光をケージド試薬を導入した試料79に照射する。照射された部位のケージド試薬のケージド基が開裂し、内部に包含されている物質が放出される。この放出による試料79内のイオン濃度分布の変化を第1の走査光学系Aのレーザ光源61からのレーザ光により得られる蛍光画像により測定する。ケージド試薬の開裂に伴い、また、第2のレーザ光源71のレーザ光の照射によっても、試料79の蛍光指示薬がある程度の蛍光を生じる。しかし、コントロールユニット81により各レーザ光のレーザシャッタ63、72の開閉タイミングと光電変換素子70での検出タイミングを時間的に制御しているので、ケージド試薬の開裂に伴う蛍光指示薬からの蛍光強度の変化の影響を受けずに蛍光のスペクトルを光検出器で検出して蛍

50

光画像を得ることができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2000-275529号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、特許文献1に記載されている第1および第2の走査光学系を有する走査型レーザ顕微鏡では、第2の走査光学系のレーザ光が第1の走査光学系の光検出器にて検出されてしまう可能性がある。従って、所望の蛍光画像を得るためには更に改善の余地があった。

10

【0007】

例えば、ケージド試薬を開裂するための第2の走査光学系Bのレーザ光源71として、UVパルスレーザ(波長351nm)を用いる場合を考える。ケージド試薬を開裂するためには強い光強度が必要であるため、照射した第2の走査光学系のレーザ光の試料79からの反射光も強くなる。ダイクロイックミラー75では十分にUVパルスレーザ光の反射光が吸収されず、僅かながら第1の走査光学系Aの光路に透過してしまう。しかし、通常、第1の走査光学系Aつまり、画像取得用の走査光学系に使用されている、ダイクロイックミラー62、吸収フィルタ67等の各フィルタ類は、UVレーザの短波長域についての透過性能を考慮しているものはほとんどない。UVパルスレーザの波長は反射および透過して光電変換素子70で検出され、鮮明な蛍光画像を得ることができない。

20

【0008】

同様に、ケージド試薬を開裂するための第2の走査光学系のレーザ光源71として、IRパルスレーザ(波長710nm)を用いる場合を考える。なお、このIRパルスレーザは2光子励起を引き起こすことのできるレーザとする。このIRパルスレーザについても、試料79からの強い反射光がダイクロイックミラー75で十分に反射されずに、僅かながら第1の走査光学系Aの光路に透過してしまう。通常、第1の走査光学系Aつまり、画像取得用の走査光学系に使用されている各フィルタ類は、短波長を反射、長波長を透過するロングパスフィルタを使用している場合が多い。そして、これらの吸収フィルタについては、IRの長波長域での透過特性が考慮されていない。そのため、蛍光波長より長波長のIRパルスレーザ光の波長はこれらの吸収フィルタを透過してしまい、光検出器で検出される。したがって、鮮明な蛍光画像を得ることができない。

30

【0009】

また、上記の現象を防ぐために、特許文献1に記載されているようにレーザ照射のタイミングをずらすなどの第1および第2の走査光学系をコントロールユニット81で制御して、第2の走査光学系Bのレーザ光の影響を避けることが考えられる。しかし、この場合、走査光学系と検出光学系の制御を、同時かつ高速に行うことが必要であるため、これを実現するためには複雑な制御が必要となる。さらに、特許文献1に記載された技術では同時に2つのレーザ光を照射することができない。このため、試料79の時間的な変化を測定するにはリアルタイム性が低下してしまう。

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明に係る請求項1に記載の走査型レーザ顕微鏡は、可視領域にスペクトルを有する第1のレーザ光を試料上で走査して前記試料を励起して蛍光を発生させる第1の走査光学系と、前記第1の走査光学系内の光路中に配されて前記試料からの蛍光を前記第1のレーザ光の光路から分離する第1ダイクロイックミラーと、前記第1ダイクロイックミラーで分離された蛍光を検出する光検出器と、前記第1ダイクロイックミラーと前記光検出器との間に配置され前記第1のレーザ光を遮断し前記蛍光を透過する測光フィルタと、紫外または赤外領域にスペクトルを有する第2のレーザ光を試料上の特定の部位に導入するため

50

の第2の走査光学系と、前記第1ダイクロイックミラーと前記光検出器との間に配置され前記第2のレーザ光の透過を制限する吸収フィルタと、前記吸収フィルタを複数配設することができる第1切換手段と、を備え、前記第1切換手段には、紫外領域にスペクトルを有するレーザ光の透過率を0.01%以下とする透過特性を有する吸収フィルタ、及び、赤外領域にスペクトルを有するレーザ光の透過率を0.01%以下とする透過特性を有する吸収フィルタが配設され、前記光検出器と前記測光フィルタが複数設けられ、光検出器に向けて試料からの蛍光を分光する第2ダイクロイックミラーを前記第1ダイクロイックミラーと光検出器との間に備え、前記吸収フィルタは、前記第1ダイクロイックミラーと前記第2ダイクロイックミラーとの間に配置され、前記測光フィルタはそれぞれの光検出器と前記第2ダイクロイックミラーとの間に配置された走査型レーザ顕微鏡であって、前記第2の走査光学系の第2のレーザ光の光源として、紫外領域にスペクトルを有するレーザ光源と、赤外領域にスペクトルを有するレーザ光源を有し、前記第2の走査光学系は、前記2つのレーザ光源のうちの1つを前記第2のレーザ光の光源として選択するレーザ選択手段を有し、前記第1切換手段は、前記レーザ選択手段と連動して対応する前記吸収フィルタを配置する。

10

【0011】

本発明に係る請求項2に記載の走査型レーザ顕微鏡は、上記記載の走査型レーザ顕微鏡において、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を前記第2のレーザ光の光路から分離する第3ダイクロイックミラーと、前記第3ダイクロイックミラーを複数配設することができる第2切換手段と、をさらに備え、前記第2切換手段には、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を紫外領域にスペクトルを有する前記第2のレーザ光から分離する特性を有する第3ダイクロイックミラー、及び、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を赤外領域にスペクトルを有する前記第2のレーザ光から分離する特性を有する第3ダイクロイックミラーが配設され、前記第2切換手段は、前記レーザ選択手段と連動して対応する前記第3ダイクロイックミラーを前記試料と前記第1ダイクロイックミラーとの間に配置する。

20

【0012】

本発明に係る請求項3に記載の走査型レーザ顕微鏡は、上記記載の走査型レーザ顕微鏡において、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を前記第2のレーザ光の光路から分離する第3ダイクロイックミラーと、前記第3ダイクロイックミラーを複数配設することができる第2切換手段と、をさらに備え、前記第2切換手段には、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を紫外領域にスペクトルを有するレーザ光から分離する特性を有する第3ダイクロイックミラー、及び、前記第1のレーザ光および試料からの蛍光を赤外領域にスペクトルを有するレーザ光から分離する特性を有する他の第3ダイクロイックミラーが配設された。

30

本発明に係る請求項4に記載の走査型レーザ顕微鏡は、上記記載の走査型レーザ顕微鏡において、前記第2の走査光学系は、紫外または赤外領域にスペクトルを有する第2のレーザ光を選択するレーザ選択手段を有し、前記第2切換手段は、前記レーザ選択手段と連動して対応する前記第3ダイクロイックミラーを配置する。

40

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、検出光路上に特異現象を発現させるレーザ光を遮断するフィルタを配置することで、画像取得用レーザ光と特異現象発現用レーザ光を同時に照射でき、鮮明な蛍光画像を取得できる走査型レーザ顕微鏡を提供できる。

【0014】

また、画像取得用の走査光学系および特異現象を発現させる走査光学系の結像レンズを別構成とすることで、システムアップを行いやすい走査型レーザ顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の第1の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡の構成図。

50

- 【図2】フィルタの透過率波長特性を示す図。
 【図3】ダイクロイックミラーの透過率波長特性を示す図。
 【図4】吸収フィルタの特性と構成を説明する概念図。
 【図5】他の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡の構成図。
 【図6】他の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡の構成図。
 【図7】従来の走査型レーザ顕微鏡の構成を示す図。
 【発明を実施するための形態】

【0016】

[参考の実施の形態(第1の実施の形態)]

本発明の第1の実施の形態について説明する。図1は本発明に係る走査型レーザ顕微鏡の構成図である。 10

【0017】

この走査型レーザ顕微鏡は、第1の走査光学系Aと第2の走査光学系Bを備えている。第1の走査光学系Aは、第1のレーザ光源11から出力されるレーザ光11aで試料29面上を走査する観察用の光学系である。第2の走査光学系Bは試料の特定部位に特異現象を発現させるための光学系である。即ち、第2の走査光学系Bは、第2のレーザ光源21から出力されるレーザ光21aを試料29の任意の位置に照射して、ケージド試薬を解除させる。

【0018】

第1の走査光学系Aは、第1のレーザ光源11、ダイクロイックミラー12、第1のレーザシャッタ13、第1の走査光学ユニット14、瞳投影レンズ15およびミラー16から構成される。さらに第1の走査光学系Aのダイクロイックミラー12の分岐光路上には、検出光学系Cが配置されている。この検出光学系Cは、吸収フィルタ31、ダイクロイックミラー17、ミラー18、蛍光測光フィルタ19aおよび19b、共焦点レンズ110aおよび110b、共焦点絞り111aおよび111bおよび光電変換素子112aおよび112bにより構成される。 20

【0019】

吸収フィルタ31は、試料29からの第2の走査光学系Bのレーザ光21aの反射光を吸収する特性を有する。通常、ケージド試薬の解除にはUV光が使用される。そこで、以下のようなレーザ光源を使用することが考えられる。 30

【0020】

(a) 第2のレーザ光源21として、UVパルスレーザ(波長351nm)を使用する。

【0021】

(b) 第2のレーザ光源21として、IRパルスレーザ(波長710nm)を使用する。なお、IRパルスレーザは、2光子励起現象を引き起こすことのできるレーザとする。

【0022】

従って、吸収フィルタ31の特性としては、上記のレーザ光を吸収する特性を有するものであり、具体的には図2に示すような特性を有するフィルタを用いる。

【0023】

図2(a)は、UVパルスレーザ(波長351nm)を遮断するフィルタ特性を示す図であり、図2(b)は、IRパルスレーザ(波長710nm)を遮断するフィルタ特性を示す図である。 40

【0024】

第2の走査光学系Bは、ケージド試薬を解除させるための第2のレーザ光源21、第2のレーザシャッタ22、第2の走査光学ユニット23、瞳投影レンズ24およびダイクロイックミラー25から構成される。第1の走査光学系Aの光軸と第2の走査光学系の光軸とは、ダイクロイックミラー25により合成され、結像レンズ26、対物レンズ27に導かれる。また、瞳投影レンズ15および瞳投影レンズ24の焦点位置は、結像レンズ26の焦点位置と一致するように配置されている。試料29はステージ28上に置かれている。

【 0 0 2 5 】

ここで、第1のレーザ光源11と第2のレーザ光源21として考えられる組合せと、その条件に適合するダイクロイックミラー25の特性は以下のとおりである。

【 0 0 2 6 】

第1のレーザ光源11に可視連続レーザ(波長488nm)、第2のレーザ光源21としてUVパルスレーザ(波長351nm)を用いる場合は、ダイクロイックミラー25の透過率波長特性は、図3(a)に示すように、可視連続光レーザ(波長488nm)及びその蛍光(波長530nm)を透過し、UVパルスレーザ(波長351nm)を反射する特性を有している。

【 0 0 2 7 】

第1のレーザ光源11に可視連続レーザ(波長488nm)、第2のレーザ光源21としてIRパルスレーザ(波長710nm)を用いる場合は、ダイクロイックミラー25の透過率波長特性は、図3(b)に示すように、ダイクロイックミラー25は、可視連続光レーザ(波長488nm)及びその蛍光(波長530nm)を透過し、IRパルスレーザ(波長710nm)を反射する特性を有している。

【 0 0 2 8 】

第1のレーザ光源11にIRパルスレーザ(波長850nm)、第2のレーザ光源21としてIRパルスレーザ(波長710nm)を用いる場合は、ダイクロイックミラー25の透過率波長特性は、図3(c)に示すように、IRパルスレーザ(波長850nm)及び波長530nmの蛍光を透過し、IRパルスレーザ(波長710nm)を反射する特性

【 0 0 2 9 】

なお、ここで使用するIRパルスレーザは、2光子励起現象を引き起こすことのできるレーザである。

【 0 0 3 0 】

前記第1のレーザシャッタ13、第2のレーザシャッタ22、第1の光学走査ユニット14、第2の光学走査ユニット23、光電変換素子112aおよび光電変換素子112bは、コントロールユニット211に接続されている。このコントロールユニット211には、CRTディスプレイ212が接続されている。コントロールユニット211は後述するように、第2の走査光学系Bからのレーザ光の試料29への照射を第1の走査光学系Aの走査に同期させる。

【 0 0 3 1 】

次に、このように構成した走査型レーザ顕微鏡の作用を説明する。第1のレーザ光源11からのレーザ光11aは、コントロールユニット211により開閉制御される第1のレーザシャッタ13が開状態のときに通過する。そしてレーザ光11aは、第1の走査光学ユニット14へ導かれ、コントロールユニット211により制御されて任意の方向に走査される。レーザ光11aはさらに、瞳投影レンズ15、ミラー16、ダイクロイックミラー25、結像レンズ26、対物レンズ27を介して、試料29の断面210上に集光され、試料の断面210内を2次元走査する。

【 0 0 3 2 】

試料29には、第1のレーザ光源11の波長によって励起される蛍光指示薬(例えばFluor-3、励起波長488nm、蛍光波長530nm)が導入されている。試料の断面210内をレーザ光が走査することにより、蛍光指示薬が励起されて蛍光を生じる。対物レンズ27に入射した蛍光は、上記レーザ光と同じ光路を逆向きに進み、対物レンズ27、結像レンズ26、ダイクロイックミラー12へ導かれる。ダイクロイックミラー12は、第1のレーザ光源11からのレーザ光11aの波長より長波長の光を反射する特性を備えている。従って、これにより上記蛍光はダイクロイックミラー12により反射され、検出光学系Cへ導入される。

【 0 0 3 3 】

検出光学系Cにおいて、試料29が多重染色されている場合、吸収フィルタ31を通過

10

20

30

40

50

した蛍光は、ダイクロイックミラー 17 により各波長の蛍光に分光される。分光した光のうち特定の波長の光が、それぞれ蛍光測光フィルタ 19 a および 19 b を通過し、共焦点レンズ 110 a および 110 b で集光される。そして、試料の断面 210 と光学的に共役な位置に設けられている共焦点絞り 111 a および 111 b によって、試料の断面 210 からの光のみが光電変換素子 112 a および 112 b へ入射する。

【0034】

光電変換素子 112 a および 112 b からの出力信号は、コントロールユニット 211 へ導かれる。出力信号は走査制御に同期してデジタル信号に変換され、走査位置に対応して CRT ディスプレイ画面 212 上に表示される。表示された画像は、試料の断面 210 での蛍光輝度の 2 次元分布である蛍光画像、すなわち所望のイオン濃度の断面 210 内での分布を示している。

10

【0035】

一方、第 2 のレーザ光源 21 からのレーザ光 21 a は、コントロールユニット 211 が開閉制御する第 2 のレーザシャッタ 22 が開状態のときに通過する。レーザ光 21 a は、第 2 の走査光学ユニット 23、瞳投影レンズ 24、ダイクロイックミラー 25 を介して第 1 の走査光学系 A からのレーザ光 11 a と同じ光軸上を進行する。そしてレーザ光 21 a は、結像レンズ 26、対物レンズ 27 を通過して、試料 29 の断面 210 上に照射される。この時、コントロール 211 により第 2 の走査光学ユニット 23 を制御することで、第 1 の走査光学系 A の走査位置と独立に断面 210 内での照射位置を選択することができる。

20

【0036】

第 2 のレーザ光源 21 からのレーザ光 21 a が、ケージド試薬を導入した試料 29 に照射されると、照射された部位のケージド試薬のケージド基が開裂し、内部に包含されている物質が放出される。この放出による試料 29 内の上記イオン濃度分布の変化を、第 1 の走査光学系 A により得られる蛍光画像により測定できる。

【0037】

このとき、試料 29 上で反射した第 2 のレーザ光源 21 からのレーザ光 21 a を含む反射光は、試料 29 の断面 210 上で発生した蛍光と同じ光路を進行する。ダイクロイックミラー 25 へ達したレーザ光 21 a を含む反射光のうち数%の光はダイクロイックミラー 25 を透過して第 1 の走査光学系 A の光路へ導入される。第 1 の走査光学系 A へ導入された第 2 のレーザ光を含む反射光は、ミラー 16、瞳投影レンズ 15、走査光学ユニット 14 を通過して、ダイクロイックミラー 12 で反射され検出光学系の光路へ導かれる。

30

【0038】

ダイクロイックミラー 12 で反射されたレーザ光 21 a を含む反射光は、予め検出光学系 C の光路上に配置されたレーザ光 21 a を吸収する特性を備えた吸収フィルタ 31 で吸収される。従って、蛍光のみが吸収フィルタ 31 を通過し、光電変換素子 112 a、112 b で検出されるようになる。

【0039】

ここで、本実施の形態において用いる吸収フィルタ 31 の透過特性について説明する。

【0040】

試料 29 に照射される励起レーザ光である第 2 の走査光学系 B からのレーザ光 21 a の強度に対して、試料 29 より発生する蛍光の強度は非常に弱い。従って、試料 29 で反射したレーザ光 21 a が試料や途中の光学系で反射することによって減衰したとしても、試料 29 から発生して検出器 112 a、112 b に向う蛍光の強度に比較して、1000 倍または、それ以上となることが多い。従って、これらの反射したレーザ光 21 a の影響を受けずに蛍光画像を鮮明に取得するには蛍光を透過させる吸収フィルタ特性として、反射したレーザ光 21 a の透過率を少なくとも 0.01% 以下にする必要がある。

40

【0041】

ところで、このような特性を実現するために、多層膜コーティングを用いた干渉フィルタが使用される。干渉フィルタは、屈折率や膜厚の異なる層を多数重ねあわせ、光を干渉

50

させて透過率を制御する。しかし干渉フィルタは、波長帯域に対してフラットな透過率特性を実現するのは困難なため、通常は、目的とする透過波長と遮断波長を設定し、その波長で所望の特性が得られるように製造される。従来、蛍光波長を選択する吸収フィルタとして実際に製造されるものは、蛍光に対応する励起波長のみを透過率0.01%以下とするのが一般的であった。

【0042】

即ち、従来の吸収フィルタは、「蛍光を取り出す機能」を有するフィルタであって、本実施の形態で用いる吸収フィルタ31が更に有する、第2走査光学系を設けた場合の「第2レーザ光」を遮断する機能を備えていないと考えられる。

【0043】

図4(a)は、本実施の形態の吸収フィルタの特性を説明する図である。

【0044】

図4(a)では、第1のレーザ光を可視連続レーザ光(波長488nm)、第2のレーザ光をUVパルスレーザ光(波長351nm)、試料からの光を蛍光(波長530nm)として表わしている。

【0045】

図4(a)の上部には、第1のレーザ光、第2のレーザ光及び試料からの光の強度分布を示している。この図に示すように、第2のレーザ光の強度は、第1のレーザ光の強度よりも強い場合が多い。これは、第2のレーザ光が試料に刺激を与えたり、試料を操作する目的で用いられるためである。このことから、第2のレーザ光を第1のレーザ光よりも確実に遮断する必要性が高いことがわかる。

【0046】

図4(a)の下部には、本実施の形態の吸収フィルタの透過特性の概念を示している。

【0047】

上述のように、本実施の形態の吸収フィルタは2つの機能を備えている。即ち、「蛍光を取り出す機能」である第1の機能を実現するための透過機能と、「第2のレーザ光を遮断する機能」である第2の機能を実現するための透過特性と備えている。この2つの機能を備えることで明瞭な蛍光像を得ることが可能となる。

【0048】

本実施の形態の吸収フィルタを実現するために、図1に示すように「蛍光を取り出す機能」(第1の機能)を持つ蛍光測光フィルタ19a、19bと「第2レーザ光遮断機能」(第2の機能)を持つ吸収フィルタ31とをそれぞれ配置する。また図4(b)に示すように、一枚のガラスの両面にそれぞれの機能をもつフィルタ膜31a、32aを生成しても良い。図4(b)に示すフィルタを使用する場合、図1のフィルタ19a、19bの代わりに使用すれば良い。このとき、フィルタ31は必要でない。

【0049】

このように、検出光学系Cに上述の透過特性を持つ吸収フィルタ31を用いて構成することで、試料29からの反射光に含まれるレーザ光21aを確実に除去することができ、鮮明な蛍光画像が得られる。また第1のレーザ光11aと第2のレーザ光21aの同時照射も可能となる。更に、試料29が多重染色されている場合、図1に示すように吸収フィルタ31は検出光学系Cの共通光路へ配設すれば良いため、容易に構成することができる。

【0050】

[第2の実施の形態]

本発明の第2の実施の形態について説明する。図5は本発明に係る走査型レーザ顕微鏡の構成図である。第1の実施形態と同一部分には、同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0051】

第2の実施の形態では、第2の走査光学系Bのレーザには、UVパルスレーザ34と波長可変可能で2光子励起現象を引き起こすことができるIRパルスレーザ35とが用いら

10

20

30

40

50

れる。そして、これらのレーザ34、35はレーザシャッタ36および37の開閉制御により選択して使用することができる。また、第1の走査光学系Aからのレーザ光11aの光軸と第2の走査光学系Bからのレーザ光34aもしくは35aの光軸とを合成する位置にダイクロイックミラー25が配置されている。ダイクロイックミラー25は、複数のダイクロイックミラーを備えることのできる電動ターレット32に少なくとも一つ配設されている。

【0052】

さらに、第2の走査光学系Bのレーザ光源からのレーザ光34aもしくは35aを遮断するために、吸収フィルタ31が検出光学系Cの光路上に配置されている。この吸収フィルタ31は複数の吸収フィルタを備えることのできる電動ターレット33に少なくとも一つ配設されている。

10

【0053】

なお、電動ターレット32および33は、通常、回転式であるが必要に応じてスライド式としても良い。

【0054】

また、前記電動ターレット32、33、レーザシャッタ36、37は、それぞれコントローラユニット211に接続され、コントローラユニット211より制御が可能である。

【0055】

このように構成した走査型レーザ顕微鏡の作用を説明する。第2の走査光学系Bのレーザ光源としてUVパルスレーザ34を用いる。第1の走査光学系Aのレーザ光源11からレーザ光11aおよび、第2の走査光学系Bのレーザ光源より出力されるUVパルスレーザ光34aは、第1の実施の形態で述べたと同様に各光学素子を通過する。そして、第1の走査光学系Aからのレーザ光11aの光軸と第2の走査光学系BからのUVパルスレーザ光34aの光軸が、ダイクロイックミラー25で合成される。ダイクロイックミラー25は、第1の走査光学系Aからのレーザ光11aを透過し、第2の走査光学系Bからのレーザ光であるUVパルスレーザ光34aを反射するような特性を有する。ダイクロイックミラー25は、レーザシャッタ36の開閉動作と連動して動作する電動ターレット32によって光路上に配置される。

20

【0056】

ダイクロイックミラー25で合成された第1および第2のレーザ光源からの各レーザ光は、第1の実施の形態と同様に、結像レンズ26、対物レンズ27を透過して、試料29の断面210上に集光される。UVパルスレーザ光34aによりケージド試薬が解除され、第1の走査光学系Aからのレーザ光11aにより、蛍光指示薬が励起されて蛍光が発生する。

30

【0057】

試料29より発生した蛍光と試料からの反射光であるUVパルスレーザ光34aが、第1の走査光学系Aの光路を逆方向に進行し、ダイクロイックミラー12を介して蛍光およびUVパルスレーザ光34aの反射光が検出光学系Cに導入される。

【0058】

検出光学系Cに導入された蛍光およびUVパルスレーザ光34aのうち蛍光は、吸収フィルタ31を通過し、UVパルスレーザ光は吸収フィルタ31で吸収される。尚、電動ターレット33はレーザシャッタ36の開閉動作と連動して動作し、UVパルスレーザ光を吸収するような透過特性を有する吸収フィルタ31を光路上に予め配置する。

40

【0059】

吸収フィルタ31を通過した蛍光は第1の実施の形態で述べたと同様に各光学素子を通過する。そして蛍光は、光電変換素子112aおよび112bで検出される。検出信号はコントローラユニット211で信号処理された後、CRTディスプレイ212上に表示される。

【0060】

50

一方、ケージド試薬を解除するため、もしくは、タンパク質（例えばYFP）を発現させた試料を光褪色させるために、第2の走査光学系Bのレーザ光としてIRパルスレーザ35を用いる場合がある。この場合、第1の走査光学系Aからのレーザ光の光軸と第2の走査光学系BからのIRパルスレーザ光35aを合成するダイクロイックミラー25は、第1の走査光学系Aからのレーザ光11aを透過し、IRパルスレーザ光35aを反射する透過特性を有する。そして電動ターレット32は、レーザシャッター37の開閉動作と連動してダイクロイックミラー25を光路上に予め配置する。

【0061】

また、検出光学系Cにおいても、吸収フィルタ31は蛍光を透過し、反射光であるIRパルスレーザ光35aを吸収するような透過特性を有している。そして、電動ターレット33がレーザシャッター37の開閉動作と連動して吸収フィルタ31を予め光路上に配置する。

10

【0062】

このように第2の実施の形態においては、第1の走査光学系Aからのレーザ光の光軸と第2の走査光学系Bからのレーザ光の光軸とを合成するダイクロイックミラー25を電動ターレット上に備えている。更に、検出光学系Cに試料29からの反射光である第2の走査光学系Bのレーザ光を吸収するような吸収フィルタ31を電動ターレット33に備えている。そして、前記電動ターレット32および33をレーザシャッター36および37の開閉動作と連動して動作させる。これによって、ケージド試薬の解除等に使用する第2の走査光学系Bのレーザ光源として、UVパルスレーザ34もしくはIRパルスレーザ35のいずれかを選択して使用することが可能なシステムを提供することができる。

20

【0063】

また、電動ターレット32、33に代えて手動ターレットを用いれば、同様の性能を有するシステムを安価で提供することができる。

【0064】

[参考の実施の形態(第3の実施の形態)]

本発明の第3の実施の形態について説明する。図6は本発明に係る走査型レーザ顕微鏡の構成図である。第1および第2の実施形態と同一部分には、同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0065】

本実施の形態の走査型レーザ顕微鏡は、観察用の第1の走査光学系Aの結像レンズ41と第2の走査光学系Bの結像レンズ43をそれぞれ独立に配置し、対物レンズ27を共用する構成になっている。

30

【0066】

第1の走査光学系Aは、走査型レーザ顕微鏡Dとして構成されている。第1の走査光学系Aは、第1のレーザ光源11、第1のレーザシャッター13、ダイクロイックミラー12、第1の走査光学ユニット14、瞳投影レンズ15、結像レンズ41、ダイクロイックミラー42および対物レンズ27から構成される。ダイクロイックミラー42は、複数のダイクロイックミラーを備えることのできる電動ターレット47に少なくとも一つ配置されている。さらに第1の走査光学系Aのダイクロイックミラー12の分岐光路上には、検出光学系Cが配置されている。検出光学系Cについては、第2の実施の形態と同様なので、説明を省略する。

40

【0067】

前記第1の走査光学系Aの電動ターレット47に備えられているダイクロイックミラー42は、第1の走査光学系Aからのレーザ光の波長および長波長の光を反射すると共に、第2の走査光学系Bからのレーザ光を透過する特性を有している。

【0068】

第2の走査光学系Bは、照明光導入装置Eとして構成されている。第2の走査光学系Bは、第2のレーザ光源21、第2のレーザシャッター22、第2の走査光学ユニット23、瞳投影レンズ24、結像レンズ43およびミラー44から構成される。

50

【 0 0 6 9 】

なお、第 2 の走査光学系 B は、第 2 の走査光学ユニット 2 3 を省略して構成しても良い。

【 0 0 7 0 】

第 2 のレーザシャッタ 2 2 と第 2 の走査光学ユニット 2 3 は第 2 のコントロールユニット 4 5 で制御される。第 2 のコントロールユニット 4 5 は第 1 の走査光学系 A との同期制御のために第 1 のコントロールユニット 4 6 に接続されている。

【 0 0 7 1 】

なお、第 2 のコントロールユニット 4 5 は必ずしも必要ではない。第 2 のレーザシャッタ 2 2 と第 2 の走査光学ユニット 2 3 とを、直接第 1 のコントロールユニット 4 6 に接続しても良い。

10

【 0 0 7 2 】

また、本実施の形態では走査型レーザ顕微鏡 D、照明光導入装置 E は、それぞれ独立したユニットとして構成されており、かつ両者は、例えばアリ構造またはボルト締結などにより、取り付け、取り外しが可能な構造になっている。

【 0 0 7 3 】

次に、このように構成した走査型レーザ顕微鏡の作用について説明する。第 1 の走査光学系 A のレーザ光源 1 1 から出射したレーザ光 1 1 a は、第 1 の走査光学系 A の各光学素子を通り、結像レンズ 4 1 で平行光となる。そしてレーザ光 1 1 a は、ダイクロイックミラー 4 2 で反射され対物レンズ 2 7 で集光され試料 2 9 の断面 2 1 0 上を走査する。試料 2 9 の断面 2 1 0 からの蛍光は、第 1 の実施の形態で述べたと同様な光路を進み検出光学系 C で検出される。

20

【 0 0 7 4 】

一方、第 2 の走査光学系 B のレーザ光源 2 1 から出射したレーザ光 2 1 a は、第 2 の走査光学系 B の各光学素子を通り結像レンズ 4 3 で平行光となる。そしてレーザ光 2 1 a は、ミラー 4 4 で反射されダイクロイックミラー 4 2 を介して、第 1 の走査光学系 A からの光軸と合成される。そしてレーザ光 2 1 a は、対物レンズ 2 7 で集光され、試料 2 9 の断面 2 1 0 上に照射される。

【 0 0 7 5 】

第 1 のコントロールユニット 4 6 は第 2 のコントロールユニット 4 5 および第 2 の走査光学ユニット 2 3 を制御することで、第 1 の走査光学ユニット 1 4 の走査位置および範囲と独立した第 2 の走査光学系 B による照射位置および範囲を選択することができる。

30

【 0 0 7 6 】

このように第 3 の実施の形態においては、第 1 の走査光学系 A は結像レンズ 4 1 を備え、第 2 の走査光学系 B は結像レンズ 4 3 を備えている。従って、結像レンズ 4 1、4 3 を透過したレーザ光は平行光となるため、第 1 の走査光学系 A の光軸と第 2 の走査光学系 B の光軸を容易に合わせることができる。

【 0 0 7 7 】

つまり、第 1 の走査光学系 A を備える走査型レーザ顕微鏡 D と第 2 の走査光学系 B を備える照明光導入装置 E との接続部分の光束が平行光になるので、走査型レーザ顕微鏡 D と照明光導入装置 E を接続する際の光軸合せが簡単になる。

40

【 0 0 7 8 】

また、第 1 の走査光学系 A を走査型レーザ顕微鏡 D として構成し、第 2 の走査光学系 B を照明光導入装置 E として構成することができる。従って、それぞれを異なる装置として構成することができるため、照明光導入装置 E を走査型レーザ顕微鏡 D のシステムアップ用の装置として提供できる。

【 0 0 7 9 】

また、照明光導入装置 E を第 2 の走査光学系 B の走査光学ユニット 2 3 を含まない構成とすれば、制御が容易で安価な装置として提供できる。

【 0 0 8 0 】

50

なお、本発明に係る走査型レーザ顕微鏡は上述の各実施の形態に基づいて次のように構成することが可能である。

【0081】

(1) 可視領域にスペクトルを有する第1のレーザ光を試料上で走査して蛍光を励起する第1の走査光学系と、試料からの蛍光を前記第1のレーザ光の光路から分離する第1ダイクロイックミラーと、第1ダイクロイックミラーで分離された蛍光を検出する光検出器と、第1ダイクロイックミラーと光検出器との間に配置され前記第1のレーザ光を遮断し所望の蛍光を透過する測光フィルタと、紫外または赤外領域にスペクトルを有する第2のレーザ光を試料上の特定の部位に導入するための第2の走査光学系と、第1ダイクロイックミラーと光検出器との間に配置され前記第2のレーザ光の透過を制限する吸収フィルタとを備えたことを特徴とする走査型レーザ顕微鏡。

10

【0082】

(2) 前記光検出器と前記測光フィルタが複数設けられ、これらの光検出器に向けて試料からの蛍光を分光する第2ダイクロイックミラーを前記第1ダイクロイックミラーと光検出器との間に備え、前記吸収フィルタは、第1ダイクロイックミラーと第2ダイクロイックミラーとの間に配置され、前記測光フィルタはそれぞれの光検出器と第2ダイクロイックミラーとの間に配置されることを特徴とする(1)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【0083】

(3) 第2のレーザ光の波長を切り換える波長切り換え部と、第2のレーザ光の波長に応じて前記吸収フィルタを切り換えるフィルタ切り換え部とを備えることを特徴とする(1)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

20

【0084】

(4) 第2の走査光学系は、第1の走査光学系を備えた走査型レーザ顕微鏡本体に対して着脱可能であることを特徴とする(1)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【0085】

(5) 前記測光フィルタは、前記第1のレーザ光の透過率が0.01%以下であり、前記吸収フィルタは、前記第2のレーザ光の透過率が0.01%以下であることを特徴とする(1)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【0086】

(6) 試料を観察するための第1のレーザ光を試料上で走査する第1の走査光学系と、試料からの光を前記第1のレーザ光の光路から分岐する第1光分岐素子と、第1光分岐素子で分離された試料からの光を検出する光検出器と、試料を刺激または操作するための第2のレーザ光を試料上の特定の部位に照射するための第2の走査光学系と、第1光分岐素子と光検出器との間に配置され、所望の観察光を透過する第1の機能及び第2のレーザ光の透過を制限する第2の機能を有する波長選択素子とを備えたことを特徴とする走査型レーザ顕微鏡。

30

【0087】

(7) 前記波長選択素子は、干渉フィルタであることを特徴とする(6)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【0088】

(8) 前記波長選択素子は、第2のレーザ光の透過率が0.01%以下であることを特徴とする(6)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

40

【0089】

(9) 前記波長選択素子は、前記第1の機能を有する第1の干渉フィルタと、前記第2の機能を有する第2の干渉フィルタであることを特徴とする(8)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【0090】

(10) 前記波長選択素子は、基板の一方の面に第1の機能を果たす第1の干渉フィルタ膜を持ち、他方の面に第2の機能を果たす第2の干渉フィルタ膜を持つ干渉フィルタであることを特徴とする(8)に記載の走査型レーザ顕微鏡。

50

【 0 0 9 1 】

(1 1) 前記第 2 レーザ光は、紫外光または赤外光であることを特徴とする (8) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【 0 0 9 2 】

(1 2) 前記波長選択素子は、前記第 1 の機能を有する第 1 の干渉フィルタと、前記第 2 の機能を有する第 2 の干渉フィルタであることを特徴とする (7) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【 0 0 9 3 】

(1 3) 前記光検出器と前記第 1 の干渉フィルタが複数設けられ、これらの光検出器に向けて試料からの光を分光する第 2 光分岐素子を第 1 光分岐素子と光検出器との間に備え、前記第 2 の干渉フィルタは、第 1 光分岐素子と第 2 光分岐素子との間に配置され、前記第 1 の干渉フィルタは、それぞれの光検出器と第 2 光分岐素子との間に配置されることを特徴とする (1 2) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

10

【 0 0 9 4 】

(1 4) 第 2 のレーザ光の波長を切り換える波長切り換え部と、第 2 のレーザ光の波長に応じて前記第 2 の干渉フィルタを切り換えるフィルタ切り換え部とを備えたことを特徴とする (1 2) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【 0 0 9 5 】

(1 5) 前記波長選択素子は、前記第 1 の機能を有する第 1 干渉フィルタ膜と、前記第 2 の機能を有する第 2 干渉フィルタ膜を有することを特徴とする (7) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

20

【 0 0 9 6 】

(1 6) 前記第 2 レーザ光は、紫外光または赤外光であることを特徴とする (6) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【 0 0 9 7 】

(1 7) 前記波長選択素子は、前記第 1 の機能を有する第 1 の干渉フィルタと、前記第 2 の機能を有する第 2 の干渉フィルタであることを特徴とする (1 6) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【 0 0 9 8 】

(1 8) 前記光検出器と前記第 1 の干渉フィルタが複数設けられ、これらの光検出器に向けて試料からの光を分光する第 2 光分岐素子を第 1 光分岐素子と光検出器との間に備え、前記第 2 の干渉フィルタは、第 1 光分岐素子と第 2 光分岐素子との間に配置され、前記第 1 の干渉フィルタは、それぞれの光検出器と第 2 光分岐素子との間に配置されることを特徴とする (1 7) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

30

【 0 0 9 9 】

(1 9) 所望の観察光は、第 1 のレーザ光で励起された蛍光であることを特徴とする (6) に記載の走査型レーザ顕微鏡。

【 0 1 0 0 】

なお、この発明は、上記実施形態そのままに限定されるものではなく、実施段階ではその要旨を逸脱しない範囲で構成要素を変形して具体化できる。また、上記実施形態に開示されている複数の構成要素の適宜な組み合わせにより種々の発明を形成できる。例えば、実施形態に示される全構成要素から幾つかの構成要素を削除してもよい。更に、異なる実施形態に亘る構成要素を適宜組み合わせてもよい。

40

【 符号の説明 】

【 0 1 0 1 】

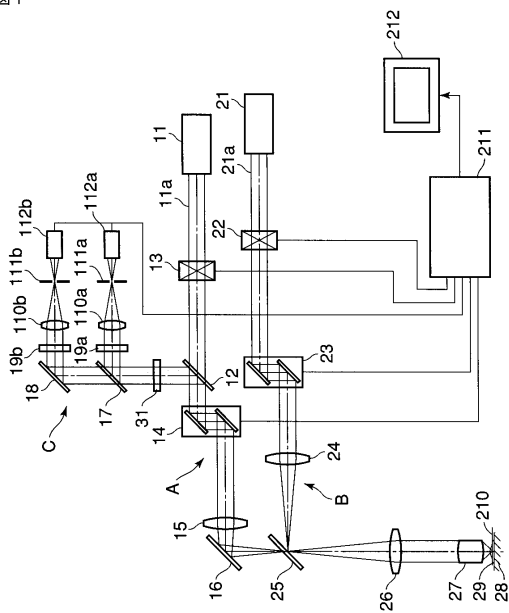
1 1 ... 第 1 のレーザ光源、 1 2 ... 第 1 のレーザシャッタ、 1 3 ... ダイクロイックミラー、 1 4 ... 第 1 の走査光学ユニット、 1 9 a ... 吸収フィルタ、 1 9 b ... 吸収フィルタ、 2 1 ... 第 2 のレーザ光源、 2 2 ... 第 2 のレーザシャッタ、 2 3 ... 第 2 の走査光学ユニット、 2 5 ... ダイクロイックミラー、 2 9 ... 試料、 3 1 ... 吸収フィルタ、 3 1 a ... フィルタ膜、 3 1 b ... フィルタ膜、 3 2 ... 電動ターレット、 3 3 ... 電動ターレット、 3 4 ... UVパルス

50

レーザ、35...波長可変IRパルスレーザ、36...レーザシャッタ、37...レーザシャッタ、47...電動ターレット、112a...光電変換素子、112b...光電変換素子。

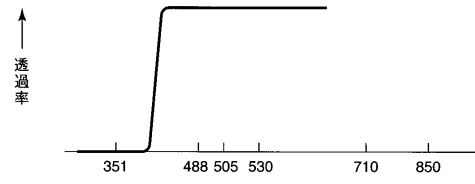
【図1】

図1

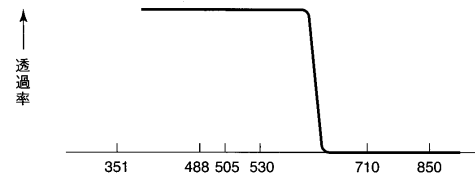


【図2】

図2



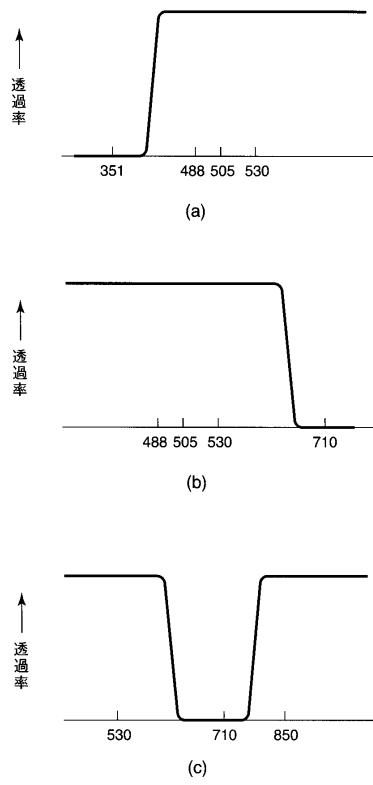
(a)



(b)

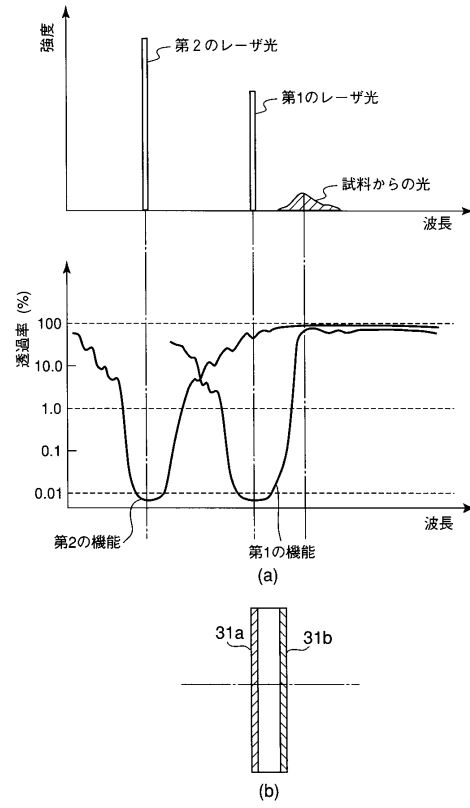
【 図 3 】

図 3



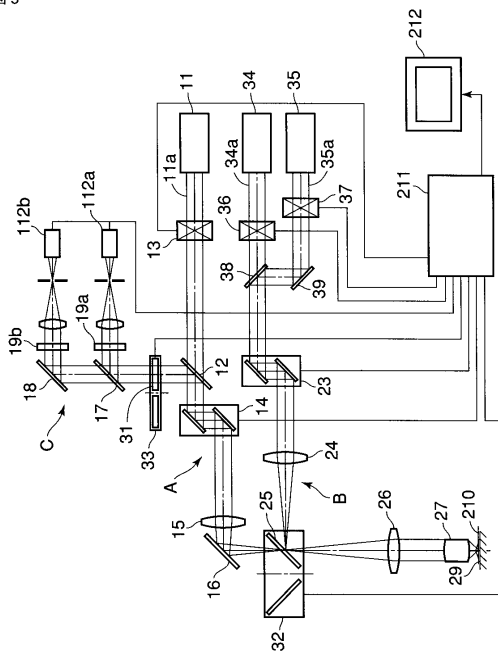
【 図 4 】

図 4



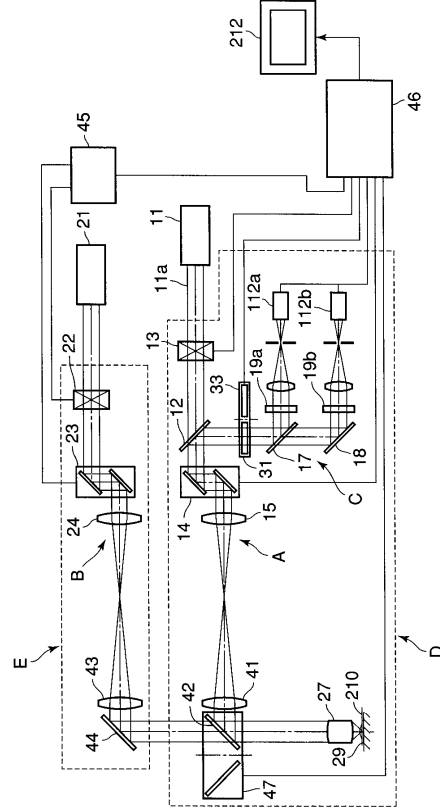
【 図 5 】

図 5



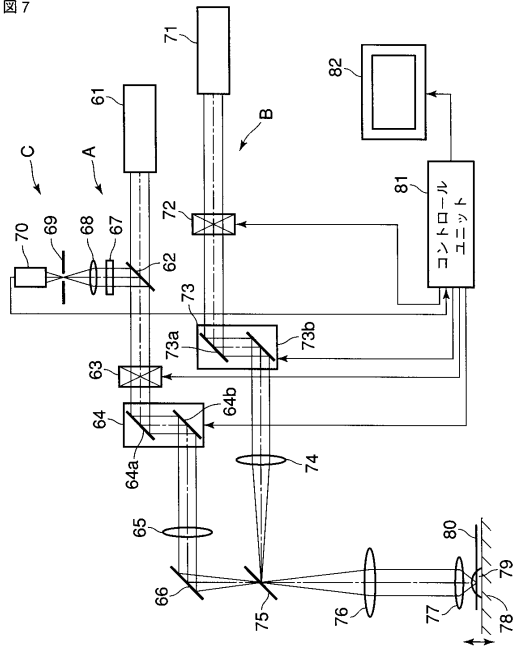
【 図 6 】

図 6



【 図 7 】

図 7



フロントページの続き

- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100101812
弁理士 勝村 紘
- (74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓
- (74)代理人 100127144
弁理士 市原 卓三
- (74)代理人 100141933
弁理士 山下 元
- (72)発明者 名取 靖晃
東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内

審査官 森内 正明

- (56)参考文献 特開平 9 - 3 2 9 7 5 0 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 3 3 0 0 2 9 (J P , A)
特開平 1 0 - 2 0 6 7 4 2 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 2 7 5 5 2 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 2 B	2 1 / 0 0	-	2 1 / 3 6
G 0 1 N	2 1 / 6 2	-	2 1 / 7 4